

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.10.2004

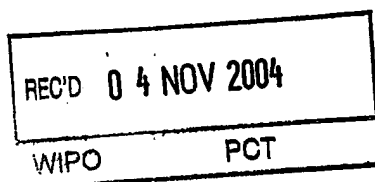
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 7月29日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-282033
[ST. 10/C]: [JP2003-282033]

出 願 人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

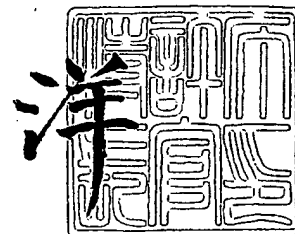


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2003TE0717
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K
C12N
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県熊本市下硯川町 2108-3-302
 【氏名】 松山 玲子
【発明者】
 【住所又は居所】 熊本県熊本市壺川 1丁目 2-11
 【氏名】 前田 浩明
【特許出願人】
 【識別番号】 000173555
 【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
 【代表者】 内野 矜自
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 056568
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

フィブリノゲンを高産生する組換えフィブリノゲン産生細胞を作製する方法であって、フィブリノゲンを構成するポリペプチドである α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖及び γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を、 γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数の1～3倍量となるように、動物細胞に組込むことを特徴とする前記の方法。

【請求項 2】

γ 鎖遺伝子の数が α 鎖遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数と同じであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項 3】

α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を有するベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターとを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を各1個ずつ有するベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を各1個ずつ有する発現ベクターとを等量混合して用いることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項 5】

α 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子を有するベクターと γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターとを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 6】

α 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクター、 β 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクター及び γ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターを混合して用いることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項 7】

SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター及びニワトリ β -アクチンプロモーターからなる群より選択されるプロモーター並びにアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子及びグルタミン合成酵素(GS)遺伝子からなる群より選択される遺伝子増幅用マーカー遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項2ないし6記載の何れかの方法。

【請求項 8】

ニワトリ β -アクチンプロモーター及びジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項2ないし6記載の何れかの方法。

【請求項 9】

α 鎖をコードする遺伝子として、 α 鎖をコードする遺伝子及びその異型である α E鎖をコードする遺伝子の両方もしくはいずれか片方を組み込むことを特徴とする請求項1ないし8記載の何れかの方法。

【請求項 10】

γ 鎖をコードする遺伝子として、 γ 鎖をコードする遺伝子及びその異型である γ' 鎖をコードする遺伝子の両方もしくはいずれか片方を組み込むことを特徴とする請求項1ないし8記載の何れかの方法。

【請求項 11】

γ 鎖をコードする遺伝子として、 γ 鎖をコードする遺伝子及びその異型である γ' 鎖をコードする遺伝子の両方もしくはいずれか片方を組み込み、且つ、 α 鎖をコードする遺伝子として、 α 鎖をコードする遺伝子及びその異型である α E鎖をコードする遺伝子の両方もしくはいずれか片方を組み込むことを特徴とする請求項1ないし8記載の何れかの方法。

【請求項 12】

動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞及びCOS細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項1ないし11

1 記載の何れかの方法

【請求項 13】

請求項 1 ないし 12 記載の何れかの方法により得られる組換えフィブリノゲン産生細胞。

【請求項 14】

組換えフィブリノゲンを高産生する組換えフィブリノゲン産生細胞を作製する方法であつて、図 1 に記載の発現ベクター p CAGGD-GB 及び p CAGGDN5-GA を等量混合し、これを動物細胞に組込むこと特徴とする前記の方法。

【請求項 15】

動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞またはCOS細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)がDG44株であることを特徴とする請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

請求項 14 ないし 16 記載の何れかの方法により得られる、100~1000 μ g/ml の組換えフィブリノゲンを生産する組換えフィブリノゲン産生細胞。

【書類名】明細書

【発明の名称】組換えフィブリノゲン高産生細胞の作製方法

【技術分野】

【0001】

本願発明は、血漿タンパク質の一つであるフィブリノゲンを多量に生産する組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法に関する。更に詳細には、フィブリノゲンを構成する3種のタンパク質、 α 鎖（もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖及び γ 鎖（もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を、それぞれの構成比が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から3倍量となるように、動物細胞に組込む工程を含む当該組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法及び当該方法により得られる組換えフィブリノゲン産生細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

フィブリノゲンは、血液凝固因子の一つとして、生体が傷害を受けた時に血液を凝固する働きを担う。第一の機能は損傷部位でフィブリンクロットと呼ばれる血栓の本体を形成ことであり、第二の機能は、血小板凝集に必要な粘着タンパク質として働くことである。フィブリノゲンの血中濃度は、通常約3mg/mlであり、アルブミン、免疫グロブリンGについて3番目に高い。

【0003】

フィブリノゲンは、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖と呼ばれる3種の異なったポリペプチドを2本ずつ有する計6本のポリペプチドからなる巨大糖蛋白質である。ポリペプチドの個々の分子量は α 鎖が約67000、 β 鎖が約56000、 γ 鎖が約47500であり、これらが集合したフィブリノゲンの分子量は、約340000に達する（非特許文献1参照）。フィブリノゲン分子は、S-S結合した α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の半分子（ $\alpha-\beta-\gamma$ ）が、さらにS-S結合したダイマー（ $\alpha-\beta-\gamma$ ）₂を形成しており、形状的には3つのノジュラー（結節・球状）構造を有している。すなわち、中央のE領域とその両外側に対称的に配置された2つのD領域、その間をつなぐ桿状部からなる構造をとっている。

【0004】

血中のフィブリノゲンには、分子サイズの異なる異型ポリペプチドを有することに起因するヘテロな分子が存在する。例えば、 γ 鎖には γ' 鎖（あるいは γ B鎖）と呼ばれる異型の存在が報告されており、これは、 γ 鎖のアミノ酸配列の408位に20個のアミノ酸残基が付加した計427個のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが明らかにされている（非特許文献2参照）。また、 α 鎖にも α Eと呼ばれる異型が存在し、このポリペプチドは、 α 鎖のアミノ酸配列の612位に236個のアミノ酸残基が伸長した計847個のアミノ酸残基を有することが報告されている（非特許文献3参照）。 γ' や α Eを有するヘテロなフィブリノゲンは、通常のフィブリノゲンと比較して、その凝固能、線溶耐性能に顕著な差は認められない。しかしながら、これらの分子種については研究段階にあり、未だ詳細な機能は解明されていない。

【0005】

フィブリノゲン製剤は、静脈投与するなどの方法により血液中のフィブリノゲン濃度を高めることによって重篤な出血を阻止するのに効果的であり、たとえば敗血症における汎発性血管内凝固症候群（DIC）のような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。

また、フィブリンの膠着性を利用した組織接着剤としても広く利用されている（非特許文献4参照）。この生体由来接着剤は、フィブリノゲンが生体内でゲル化することを利用したもので、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアーリークの閉鎖など広範にわたって使用される。また、近年フィブリノゲンをコラーゲンなどのシートに付着させることにより利便性を高めた製剤も販売されている。

【0006】

現在、医薬品として用いられているフィブリノゲンはヒト血漿から調製されたもので、その問題点として、1) 不特定多数のヒトから集めた血漿を使用するために、HAV、HBV、HCV、HEV、TTVなどの肝炎を引き起こすウイルス、HIVなどの免疫不全症を引き起こすウイルス、CJDを引き起こす異常プリオンなどの感染性病原体混入の危険性があること、2) また、日本では血漿は献血によって供給されており、将来的な安定供給が問題視されること、などが挙げられている。

これらの問題を解決するために、従来からフィブリノゲンの組換え化が試みられてきた。例えば、大腸菌では、フィブリノゲン γ 鎖の菌体内発現には成功しているが、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3つのタンパク質を同時に発現させ、機能的なフィブリノゲン分子を産生させたとの報告はない。また、酵母を用いた発現系でも一時期分泌発現に成功したとの報告もあったが、最終的には再現性が取れずその報告を取り下げている（非特許文献5参照）。このように、未だ、大腸菌や酵母を用いてフィブリノゲンを発現させることに成功したとの報告はない。

【0007】

一方、動物細胞では、BHK細胞（非特許文献6参照）やCOS細胞（非特許文献7参照）、CHO細胞（非特許文献8、9、10及び特許文献1参照）を用いて発現が試みられているが、その産生量は、1～15 μ g/ml程度にとどまっている。これらの場合、メタロチオネインプロモーター、Rous sarcoma virus LTRプロモーター、adenovirus 2 major late プロモーターのいずれかを用い、選択マーカーとしてアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、histidinol耐性遺伝子のいずれか若しくはこれらの組み合わせで私用している。いずれの場合も、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖を各々コードする遺伝子の発現ベクターを各々単独に構築し、3者で同時にトランスフェクションするか、あるいは α 鎖、 γ 鎖若しくは β 鎖、 γ 鎖遺伝子を有する各々2つの発現ベクターで先に形質転換した細胞に、後から β 鎖、 α 鎖遺伝子を有する発現ベクターを導入する方法、さらには α 鎖と γ 鎖遺伝子を有するプラスミドと β 鎖遺伝子を有するプラスミドを等量混合して導入する方法がとられている。いずれの場合も特に導入する際の各遺伝子の構成比に関する記載はなく、一般的な手法通りに各遺伝子を均等に導入していると思われる。現在使用されている血液由来のフィブリノゲンを用いた医薬品では、例えば、フィブリン糊製剤では約80mg/doseのフィブリノゲンが使われており、前述の十数 μ g/ml程度の発現量では製造施設が大規模にならざるを得ず、必然的に高コストになってしまう。遺伝子組換え技術によりフィブリノゲンを実用的なレベルで製造するためには高産生細胞（例えば、フィブリノゲンの発現量が100 μ g/ml程度）が必要であるが、現在、これを満足する動物細胞を用いた発現系の報告はみられない。

【0008】

【特許文献1】United States Patent 6037457

【0009】

【非特許文献1】「止血・血栓・線溶」松田、鈴木編集、中外医学社（1994）

【非特許文献2】Chung DEとDavie EW, Biochemistry, 23, 4232 (1984)

【非特許文献3】Lawrence YFら, Biochemistry, 31, 11968 (1992)

【非特許文献4】「特集・生体接着剤」Biomedical Perspectives, 6, 9-72 (1997)

【非特許文献5】Redman CM, Kudryk B., J. Biol. Chem., 274, 554 (1999)

【非特許文献6】Farrell DHら, Biochemistry, 30, 9414 (1991)

【非特許文献7】Roy SNら, J. Biol. Chem., 266, 4758 (1991)

【非特許文献8】Lord STら, Blood Coagul Fibrinolysis, 4, 55 (1993)

【非特許文献9】Binnie CGら, Biochemistry, 32, 107 (1993)

【非特許文献10】Lord STら, Biochemistry, 35, 2342 (1996)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

以上述べてきたように、血液由来のフィブリノゲン製剤の製造・販売においては、感染

性病原体の混入や市場への安定供給という点を危惧しなければならない。これらの問題点を解決する為に、遺伝子組換え技術によるフィブリノゲンの生産が試みられているが、これまでに報告されている発現量では、製造コストの面で実用化することが困難と予想され、改善・改良が望まれるところである。

【0011】

したがって、本願発明は、ヒトフィブリノゲンを高発現する組換えヒトフィブリノゲン産生細胞の作製方法を提供することを目的とする。

【0012】

また、本願発明の他の目的は、当該方法により得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本願発明者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、ヒトフィブリノゲンを構成する3種のタンパク質のうち、 α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から3倍量となるよう、例えば、 α 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターと β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを等量混合し、これを用いて動物細胞を形質転換することにより、容易にヒトフィブリノゲンを高発現する細胞を作製できることを見出し、本願発明を完成するに至った。

【0014】

従って、本願発明は、 α 鎖及び γ 鎖含有発現ベクターと β 鎖及び γ 鎖含有発現ベクターを等量混合した発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換する工程を含む組換えヒトフィブリノゲン産生細胞の作製方法を包含する。

【0015】

また、本願発明は、上記の方法により得られた、ヒトフィブリノゲンを高発現する組換えヒトフィブリノゲン産生細胞を包含する。

【発明の効果】

【0016】

本願発明の方法によれば、組換えヒトフィブリノゲンを高発現する産生細胞（約100～1000 μ g/ml）及びその作製方法が提供される。本願発明の組換えヒトフィブリノゲン産生細胞が生産するヒトフィブリノゲンの量は、これまでに報告されている遺伝子組換え技術によるフィブリノゲンの発現量（～15 μ g/ml）を大きく上回るものである。故に、本願発明の組換えヒトフィブリノゲン産生細胞は、実用的なレベルでのヒトフィブリノゲンの製造方法の確立を可能にし、当該製造方法が確立されることによってヒトフィブリノゲンの市場への安定供給が確保される。

また、本願発明の方法より得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞を用いれば、従来の血液を原料として製造した場合に危惧される感染性病原体の混入やその他の血液由来成分の関与を排除することができ、より安全なヒトフィブリノゲン製剤を製造・供給することが可能となる。

更に、本願発明の方法は、ヒト由来以外のフィブリノゲンを高生産する組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法としても利用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本願発明の方法は、フィブリノゲンを構成する3種の蛋白質、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を、各遺伝子の構成比が α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子の数が等量から3倍量となるように動物細胞に組込む工程を含む組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法によって特徴付けられる。

本願発明では、主としてヒト由来のフィブリノゲンを取り扱うが、ヒトに限らず他の動物由来のフィブリノゲン産生細胞を作製する方法としても用いることができる。本願発明で

用いるヒトフィブリノゲンの構成ポリペプチド、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子としては、最終的に発現産物がアッセンブルしてヒトフィブリノゲン分子を形成できる遺伝子であれば、cDNA及び染色体遺伝子の何れも使用できる。

前述したように、 α 鎖及び γ 鎖には、それぞれ α E鎖及び γ' (γ B) 鎖と呼ばれる異型が存在する。これらに加えて今後新たに見出されるかもしれない他の異型ポリペプチドをコードする遺伝子も、同様に、本願発明に使用することが可能である。

【0018】

所望の遺伝子は、例えば、文献 (Rixon MWら, Biochemistry, 22, 3237 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3244 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3250 (1983)、非特許文献2、3参照) に各々報告されている配列を元にPCR用プライマーをデザインし、ヒト肝臓などフィブリノゲンを産生している臓器や細胞由来のcDNAを鋳型にしてPCRを行うことにより取得できる。

より具体的には、フィブリノゲンの α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードするcDNAは、以下のように調製される。まず、ヒト肝細胞から全RNAを抽出し、この中からmRNAを精製する。得られたmRNAをcDNAに変換した後、それぞれの遺伝子配列に合わせてデザインされたPCRプライマーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物をプラスミドベクターに組み込み大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中から目的の蛋白をコードするcDNAを有するクローンを選択する。上記の全RNAの抽出には、市販のTRIzol試薬 (GIBCO BRL社)、ISOGEN (ニッポンジーン社) 等の試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit (Amersham BioSciences社) などの市販キット、cDNAへの変換には、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning (GIBCO BRL社) などの市販のcDNAライブラリー作製キットがそれぞれ使用される。ヒトフィブリノゲン遺伝子を取得する場合は、市販のcDNAライブラリー、例えば、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BC Bioscience) が用いられる。PCR用プライマーは、DNA合成受託機関(例えばQIAGEN社)などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5'側にKOZAK配列 (Kozak M, J.Mol.Biol., 196, 947 (1987)) 及び適切な制限酵素切断部位の配列を付加することが望ましい。好ましくは、配列番号1から6に記載の合成DNAがプライマーとして用いられる。PCR反応は、市販のAdvantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience) を用い、添付のプロトコルに従って行えばよい。PCRにより得られたDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット (インビトロジェン社) 等を用いてクローニングした後、DNAシーケンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ社) により決定される。

【0019】

このようにして得られるフィブリノゲン遺伝子、好ましくは、配列番号7から9記載の配列を有する遺伝子断片を用いて動物細胞に組み込む為の発現ベクターが構築される。動物細胞を宿主とする発現ベクターには特段の制約はないが、プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリ β アクチンなど、最終的にアッセンブルしたフィブリノゲンが得られるのであれば如何なるものでも良い。好ましくは、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGG (特開平3-168087) が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカー遺伝子として、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカー遺伝子 (Kriegler M著、加藤郁之進監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994)) が利用できる。

【0020】

以上述べた要素を組み合わせて構築される発現ベクターの好ましい例として、 γ 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターと γ 鎖及び α 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターが挙げられる。より好ましくは、図1に示すpCAGGD-GB (フィブリノゲン γ 鎖と β 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカーとしてdhfr遺伝子を持つ) とpCAGGDN5-GA (フィブリノゲン γ 鎖と α 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マ

ーカーとしてdhfr遺伝子及びneo遺伝子を持つ)が挙げられる。この2種類の発現ベクターは、 α 鎖及び β 鎖遺伝子に対する γ 鎖遺伝子の構成比が等量となるように等量混合され、動物細胞に導入される。しかしながら、本願発明はこの例に限定されるものではない。本願発明の最も重要な点は、最終的に宿主細胞に導入されたフィブリノゲンを構成する3種のポリペプチド、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする各遺伝子の宿主細胞内での存在比が、 α 鎖(及び/もしくは α 鎖の異型)遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖(及び/もしくは γ 鎖の異型)遺伝子の数が等量から3倍量となるようにすることである。したがって、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖をコードする遺伝子を用いて動物細胞を形質転換する際に、その導入遺伝子の構成比において γ 鎖が少なくとも他の2つ α 鎖及び β 鎖をコードする遺伝子に比べ等量から3倍量になるように調整して形質転換を行えば良い。この要件を満たす方法なら、上記のように各鎖をコードする遺伝子が一つの発現ベクターに存在する必要はなく、例えば、前述したように α 鎖と β 鎖を1個ずつ有する発現ベクターと γ 鎖を2個有する発現ベクターとを等量混合して、構成比を1:1:2にし、これを動物細胞に導入することもできる。あるいは、 α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖が単独で発現するように構築した発現ベクターを、それぞれ1:1:2~6の割合で混合したもので動物細胞を形質転換することもできる。若しくは、一つの発現ベクター内に α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の各遺伝子の構成比が1:1:2~6となるように構築された発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換しても良い。さらには、前述の1:1:2~6の比率に加え、1:2:3~9、1:3:4~12、2:3:5~15(あるいは2:1:3~9、3:1:4~12、3:2:5~15)など、 α 鎖(及び/もしくは α 鎖の異型)遺伝子及び β 鎖遺伝子の総数に対して γ 鎖(及び/もしくは γ 鎖の異型)遺伝子の数が等量から3倍量となるような比率であれば、本願発明の要件を満たす。また、全ての遺伝子を同時に動物細胞内に導入するのではなく、別々の時期に選択マーカを変えて動物細胞に順次導入し、最終的に細胞内に導入される α 鎖、 β 鎖及び γ 鎖の各遺伝子の存在比が前述の比になるようにしてもよい。また、導入時には上記比率でなくとも、 γ 鎖遺伝子を有する発現ベクターにdhfrやGS遺伝子など遺伝子増幅を可能にする選択マーカを付加し、細胞内で上記比率になるように遺伝子増幅を行っても構わない。

【0021】

発現ベクターを導入する宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞やSP2/0等マウスミエロマ細胞、BHK細胞、293細胞、COS細胞など様々な動物細胞が利用可能であるが、発現ベクターに使用されるプロモーター、選択及び遺伝子増幅用マーカ遺伝子に合わせて適当な細胞を選択すれば良い。例えば、ニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドを用いて構築した発現ベクターには、CHO細胞などが使用される。

【0022】

宿主細胞の形質転換するときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい(Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))。

【0023】

形質転換細胞の選択・増殖には、一般に動物細胞を形質転換する時に行われる方法を使用すればよい。例えば、形質転換後の細胞は、CHO-S-SFMII培地(GIBCO-BRL)、IS CHO-V培地(アイエスジャパン)、YMM培地等無血清培地やMEMアルファ培地、RPMI培地、ダルベッコMEM培地(いずれもGIBCO-BRL)に5-10%程度のウシ胎児血清を添加した血清培地などの一般的に動物細胞培養に用いられる培地に、使用する選択マーカに合わせてメトトレキサート、G418等を添加した選択培地を用いて、適宜培地交換をしながら、37℃前後で10~14日間程度培養される。この培養により、形質転換されていない細胞は死滅し、形質転換した細胞のみが増殖してくる。更に、形質転換細胞に対して、限界希釈法などの方法により、目的とするフィブリノゲン産生細胞株の選択及びクローン化が行われる。培養方法には、細胞の種類によってフィブリノゲンの検出・発現量の測定には、一般に蛋白質やポリ

ペプチドの検出に用いられる方法、すなわち、ELISA, RIA, WB, SDS-PAGE等の方法を利用すれば良い。また、フィブリノゲンの活性であるクロッティングを直接測定しても良い。このようにして得られた本願発明の組換えフィブリノゲン産生細胞は、血清含有の培地中において細胞約 5×10^4 個/mlで播種し、4日間培養することによって培養液1 mlあたり～約100 μ gの組換えフィブリノゲンを発現し、且つ無血清培地中においてもこのフィブリノゲン産生量を低下することなく増殖することができ、約 1.6×10^5 個/mlで播種し、約2週間の培養で培養液1 mlあたり約100～270 μ gの産生量を達成できる有用な細胞である。以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社、アマシヤムファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

【実施例1】

【0024】

(フィブリノゲン遺伝子の単離)

ヒトフィブリノゲン遺伝子は、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BC Bioscience) をテンプレートとし、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖用にそれぞれ2本ずつ作製し(配列番号1～6)、Advantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience) を用いてキットのプロトコールに従ってPCR反応を行った。この結果、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖それぞれにPCR増幅のバンドが検出された。そのサイズは既知の α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖cDNA遺伝子のサイズと一致していたため、これらの遺伝子をTAクローニングキット(インビトロジェン)を用いてクローニング(各々pFbgA、pFbgB、pFbgG)し、その塩基配列の決定をABI PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ)を用いて行った。その結果、配列番号7～9にそれぞれ示すFbgA、FbgB、FbgG遺伝子が得られた。

【実施例2】

【0025】

(フィブリノゲン遺伝子発現ベクターの構築)

本実施例に用いたフィブリノゲン β 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGD-GBならびに、フィブリノゲン α 鎖及び γ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGDN5-GAは以下のようにして構築した。pCAGGD-GBについては、まず、pCAGG-S1 dhfr (WO 03/004641) をBamHIにて消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 dhfrNを構築し、このSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGGD-Gを構築した。さらに、pCAGG(Xho) (WO 03/004641) をSalIで消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG(Xho) Nを構築し、このプラスミドのXbaI-BamHIサイトに、pCAGG-S1 (WO 03/004641) のSalIを含むXbaI-BamHI断片を組み込み、得られたプラスミドのBamHIサイトを消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 2Nを構築した。このpCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgB由来のFbgB遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGG-Bを構築した。pCAGGD-GのNotIサイトにpCAGG-BのFbgB遺伝子を含むNotI断片を組み込み、最終的なフィブリノゲン β 鎖と γ 鎖の発現ベクターpCAGGD-GB(図1)を構築した。

【0026】

一方、pCAGGDN5-GAについては、最初にpCAGG-S1 dhfr neo (WO 03/004641) を不完全なBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、そのまま自己ligationすることにより2つあるBamHIサイトのうちneo遺伝子の3'側にあるBamHIサイトを欠失させ、さらにBamHIで消化して、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてligationすることによりpCAGG-S1 dhfr neoN (pCAGGDN5-NotI)を構築した。このpCAGG-S1 dhfr neoNのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したプラスミドのNotIサイトに、pCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgA由来のFbgA遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したpCAGG-AのFbgA遺伝子を含むNotI断片を組み込み、pCAGGDN5-GA(図1)を構築した。

【実施例 3】

【0027】

(組換えフィブリノゲン発現細胞の作製：発現ベクターの細胞への導入、遺伝子増幅、クローニング)

実施例 2 で構築したフィブリノゲン発現プラスミド pCAGGD-GB 及び pCAGGDN5-GA を用いて以下に述べる方法にて、CHO DG44 (Urlaub Gら, Somatic cell. Mol. Genet., 12, 555 (1986)、以下 CHO) 細胞を形質転換した。形質転換の前日に CHO 細胞を 6 well プレートに $1-0.5 \times 10^5$ cells/2 ml/well の細胞密度で 10% ウシ胎児血清 (FCS、GIBCO-BRL 社製) を含む YMM 培地 (インシュリン・トランスフェリン・エタノールアミン・亜セレン酸ナトリウムを含むアミノ酸・ビタミンを強化した核酸不含 MEM アルファ 培地) を用い播種した。37℃、5% CO₂ 培養装置で一夜培養の後、リポソーム系形質転換試薬、TransIT-LT1 (宝) あるいはリポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン) を用いて、あらかじめフィブリノゲン発現プラスミド pCAGGD-GB 及び pCAGGDN5-GA を各々等量混合し、PvuI で消化・線状化しておいたものを導入 DNA として、それぞれのプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5% CO₂ 培養装置で一夜培養した後、選択培地、10% 透析 FCS (d-FCS: GIBCO-BRL 社製)、0.5 mg/ml Geneticin (G418: GIBCO-BRL 社製)、100nM メトトレキサート (MTX: 和光純薬工業製) を含む YMM 培地、あるいは 10% d-FCS、0.5 mg/ml G418 を含む YMM 培地に培地交換した。3~4 日毎に培地を交換しながら 37℃、5% CO₂ 培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

【0028】

得られた形質転換細胞の組換えフィブリノゲン産生を ELISA にて測定した。ELISA は以下に示す手順にて実施した。PBS (137mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄-12H₂O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄) で 10 µg/ml に調製した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体 (Dako Cytomation) 100 µl をイムノモジュールプレート (ヌンク C8-445101) にアプライし、4℃ に一晚置くことで固相化を行った。固相化したプレートの抗体溶液を除き、PBS 390 µl にて 3 回洗浄した。続いて、PBS で 4 倍に希釈したブロックエース (大日本製薬) を 370 µl アプライし、室温で 30 分から 2 時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロッキング液を除き、サンプル (培養上清) およびスタンダードを 100 µl アプライした。サンプル (フィブリノゲン産生細胞の培養上清) は、PBS で 10 倍に希釈したブロックエースを用いて 100~800 倍に希釈した。スタンダードには、Bolheal (化血研製: 血漿由来のフィブリノゲンを含むバイアル 1 を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を 80mg/ml として計算し、PBS で 1mg/ml に希釈した。) をサンプルと同じ希釈液にて 100ng/ml~1ng/ml に希釈したものを用いた。サンプルおよびスタンダードは、プレートにアプライ後、37℃ で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% Tween-20/PBS) 390 µl にて 4 回洗浄を行い、続いて、サンプル希釈に用いた溶液 (PBS で 10 倍に希釈したブロックエース) で 8000 倍に希釈した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体・パーオキシダーゼ標識を 100 µl アプライし、37℃ で 1 時間反応させた。反応終了後、洗浄液 (0.05% Tween-20/PBS) 390 µl にて 4 回洗浄を行った。発色は、TMB Substate Kit (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) 100 µl をアプライし、暗所で 30 分静置後、1 規定硫酸 100 µl で反応を停止した。反応停止後 30 分以内に、プレートリーダー (モレキュラーデバイス) にて、450nm-650nm の吸光度を測定し、検量線からフィブリノゲン濃度を求めた。

【0029】

この ELISA にて組換えフィブリノゲン産生能の高い形質転換細胞を選び出し、次に MTX 遺伝子増幅を行った。10% d-FCS、0.5 mg/ml G418 を含み、段階的に MTX 濃度を上げた YMM 培地に細胞を懸濁し、24 well プレートに 5×10^4 cells / 0.5ml / well にて播種し、3~4 日毎に培地を交換しながら 37℃、5% CO₂ 培養装置で培養を続けることで選択を行い、高濃度の MTX に耐性の形質転換体を得た。表 1 にその代表的な結果を示す (表中「*」: 細胞がコンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量)。

【0030】

【表 1】

細胞名	MTX 濃度(μ M)	産生量(μ g/ml)*
CH002-24	0.1	24.4
CH003-1A4	3	20.3
CH004-2A4	0.5	32
CH004-2A5	0.5	36
CH004-13A7B2	3	28
CH006-3A1	4	45.3
CH006-13	24	34
CH006-19A1	4	33

【0031】

このような組換えフィブリノゲン産生細胞のクローニングを行った。10% d-FCS、0.5 mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに1個/wellの濃度で200 μ l/wellずつ播種することで限界希釈によるクローニングを行った。得られたクローンについて、コンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量を調べたところ、 $\sim 56.8 \mu$ g/mlに達するクローンが得られた。その中の一つのクローンCH002-24-4を10% d-FCS、0.5mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、6 wellプレートに 2×10^5 cells/2ml/wellで播種し、4日間の培養を行い、培養上清中の組換えフィブリノゲンの量をELISA法にて測定したところ、 103.3μ g/mlに達しており、動物細胞による組換えフィブリノゲンの産生量として100 μ g/mlのオーダーを初めて超えたことを示した。

【実施例 4】

【0032】

(組換えフィブリノゲンのウエスタンブロット解析)

産生された組換えフィブリノゲンのウエスタンブロットを行った。組換えフィブリノゲン・サンプルとして、CH001-1-2細胞を 2×10^5 cells/mlの密度で10% d-FCSを含むYMM培地を用い播種し、一夜培養し、翌日培地を、FCSを含まないYMM培地に交換し、37℃、5% CO₂培養装置で4日間培養後、その培養上清中に存在する組換えフィブリノゲンを解析に用いた。

サンプルを5xSDS処理バッファー (0.3125M Tris, 5% SDS, 25% グリセロール, 0.05% ブロモフェノールブルー, 5% 2-メルカプトエタノール pH6.8) と1:4で混合し、100℃、5分間ボイルした。これらのサンプルをゲルとしてパジェル5-20% (ATTO) を使用し、泳動条件として40mA 定電流、1.5時間で電気泳動を行った。泳動後、ゲルとImmobilon Transfer Membranes (以下Membrane: MILLIPORE) を密着させ、ホライズブロット (ATTO) を用いて100mA 定電流、25分間でMembraneに泳動タンパク質をトランスファーした。Membraneはブロックエース (大日本製薬) 原液で1時間室温にてブロッキングし、次に抗ヒトフィブリノーゲン・ウサギポリクローナル抗体 (Dako Cytomation) 0.55μ g/mlを含む10% ブロックエース, 0.05% Tween-20/TBS (50mM Tris, 150mM NaCl pH7.5) に浸し、37℃、30分間振盪した。さらに0.05% Tween-20/TBSで5分振盪を3回繰り返して洗浄した後、さらにTBSで3回洗浄し、ブロックエース (大日本製薬) 原液で5分間室温にてブロッキングした。続いて、10% ブロックエース, 0.05% Tween-20/TBS にて3000倍に希釈されたGoat Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase Conjugate (BIOSOURCE) 溶液に浸し、37℃、30分間振盪した。0.05% Tween-20/TBSで5分振盪を3回繰り返して洗浄した後、さらにTBSで3回洗浄し、Phosphatase Substrate (KPL) で発色させた。

その結果を図2に示す。還元下において、CH001-1-2 培養上清中に産生された組換えフィブリノゲンは血漿由来のフィブリノゲンを含むボルヒールと同じサイズの蛋白があることが確認された。また、これら3本のバンドは既知のフィブリノゲン各鎖の分子量と一致していた (α 鎖; 66kDa、 β 鎖; 52kDa、 γ 鎖; 46.5kDa)。

【実施例 5】

【0033】

(組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養)

組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養時の産生能を調べた。実施例 3 において 10^5 cells/ml 以上の産生量を示したクローン CHO2-24-4 を、PBS にて 2 回洗浄後、表 2 に示す培地 (CHO-S-SFMII、IS CHO-V は無血清培地、10% d-FCS/YMM は血清培地) にそれぞれ懸濁し、 10^5 cells/ml で 2 ml/well of 6well プレートで播種し、4 日間培養を行い、得られた細胞数のカウントと培養上清中のフィブリノゲン産生量を前述の ELISA にて測定した。その結果、表 2 に示すように、 1×10^4 cells 当たりの組換えフィブリノゲン産生能は、血清培地 (10% d-FCS を含む YMM 培地) を用いた場合より高く、無血清培地でも血清培地と同等以上の産生能力があることが示された。このことは、一般的な高密度培養の場合 $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml は達成可能であるので、単純計算で $1000 \mu\text{g/ml}$ 以上の組換えフィブリノゲンを産生させる能力があることを示している。

【0034】

【表 2】

培地	メーカー	産生量 ($\mu\text{g}/1 \times 10^4$ cells)
10% d-FCS/YMM	自家調製	2.0
CHO-S-SFMII	GIBCO	4.4
IS CHO-V	アイエスジャパン	7.6

【0035】

さらに、この CHO-S-SFMII 培地で増殖した CHO2-24-4 細胞を、同じく CHO-S-SFMII を基本とした無血清培地 100 ml に 1.6×10^5 cells/ml で播種し、techne 社製のスピナーフラスコを用いた約 2 週間の浮遊培養 (回転数 45 rpm) で $272.7 \mu\text{g/ml}$ という、産生量を達成した。また、別クローン CHO4-2A4-3 細胞を同じく、CHO-S-SFMII を基本とした無血清培地 100 ml に 8×10^4 cells/ml で播種し、techne 社製のスピナーフラスコを用いた約 2 週間の浮遊培養 (回転数 45 rpm) で $98.2 \mu\text{g/ml}$ を達成している。このように、本願発明の方法により確立した細胞が、組換えフィブリノゲン産生に関して無血清培地で約 $100 \sim 270 \mu\text{g/ml}$ の産生量を達成し、これまでにない高産生細胞であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0036】

本願発明により得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞は、組換えフィブリノゲンを高産生するので、モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製する際の抗原として、あるいは、抗ヒトフィブリノゲン抗体とフィブリノゲンとの結合に関する研究材料として利用できる。更に、本願発明で得られるフィブリノゲンは、血液由来のフィブリノゲンと異なり、フィブリノゲン以外の血液凝固や線溶関連の因子を含まない純粋なフィブリノゲンとして調製可能である。従って、血液凝固・線溶に関連した研究の研究材料としても有用である。また、フィブリノゲンを抗原として単独で又は種々の安定剤、保護剤、防腐剤等の添加物と共に用いることにより、各種疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療剤等医薬品の提供を可能ならしめるものである。例えば、DIC のような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。また、本願発明の組換えヒトフィブリノゲンは、フィブリンの膠着性を利用して組織接着剤として、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアリークの閉鎖など広範にわたる治療、あるいは組織再生を目的とした再生医療の基剤に対する好適な薬として利用される。

このように、本願発明の方法により得られる組換えフィブリノゲン産生細胞及び当該細胞により得られる組換えヒトフィブリノゲンは、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】組換えフィブリノゲン産生細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。レーン1：Marker (Amersham Rainbow Marker 756)、レーン2：Bolheal (化血研製：血漿由来のフィブリノゲンを含むバイアル1を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を80mg/mlとして計算し、PBSで希釈した。1 μ g/lane)、レーン3：CH001-1-2 培養上清 (8 μ l/lane)、レーン4：CH001-1-2 培養上清 (24 μ l/lane)

【図2】産生された組換えフィブリノゲンのウエスタンブロットプロファイルの結果を示した図面である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> A method for the production of high expression recombinant fibrinogen producing cells

<130> 2003TE0717

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Human

<400> 1

ccccaagctt gtcgacgcca ccatgttttc catgaggatc gtctg 45

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

ccatcgatgg atccgtcgac ttactagggg gacagggaag gcttcccaa aggagaagtg 60

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

ccccaagctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattattg ctactattgt gtgttttct 60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Human

<400> 4

cggaattctg atcagtcgac ttactattgc tgtgggaaga agggcctgat cttcatactc 60

<210> 5
<211> 56
<212> DNA
<213> Human

<400> 5
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgagttg gtccttgac ccccggaatt taattc 56

<210> 6
<211> 51
<212> DNA
<213> Human

<400> 6
cggaattcgg atccgtcgac ttattaaacg tctccagcct gtttggctcc c 51

<210> 7
<211> 1980
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgttttc catgaggatc gtctgcctgg tcctaagtgt 60
ggtgggcaca gcatggactg cagatagtgg tgaagggtgac tttctagctg aaggaggagg 120
cgtgcgtggc ccaagggttg tggaaagaca tcaatctgcc tgcaaagatt cagactggcc 180
cttctgctct gatgaagact ggaactacaa atgcccttct ggctgcagga tgaaagggtt 240
gattgatgaa gtcaatcaag atttacaaa cagaataaat aagctcaaaa attcactatt 300
tgaatatcag aagaacaata aggattctca ttcgttgacc actaatataa tggaaatttt 360
gagaggcgat ttttcctcag ccaataaccg tgataatacc tacaaccgag tgcagagga 420
tctgagaagc agaattgaag tcctgaagcg caaagtcata gaaaaagtac agcatatcca 480
gcttctgcag aaaaatgta gagctcagtt ggttgatatg aaacgactgg aggtggacat 540
tgatattaag atccgatctt gtcgagggtc atgcagtagg gctttagctc gtgaagtaga 600
tctgaaggac tatgaagatc agcagaagca acttgaacag gtcattgcca aagacttact 660
tccctctaga gataggcaac acttaccact gataaaaatg aaaccagttc cagacttggc 720
tcccggaat ttaagagcc agcttcagaa ggtaccccca gagtggaagg cattaacaga 780

catgccgcag atgagaatgg agttagagag acctggtgga aatgagatta ctcgaggagg 840
ctccacctct tatggaaccg gatcagagac ggaaagcccc aggaacccta gcagtgtctg 900
aagctggaac tctgggagct ctggacctgg aagtactgga aaccgaaacc ctgggagctc 960
tgggactgga gggactgcaa cctggaaacc tgggagctct ggacctggaa gtactggaag 1020
ctggaactct gggagctctg gaactggaag tactggaaac caaaaccctg ggagccctag 1080
acctggtagt accggaacct ggaatcctgg cagctctgaa cgcggaagtg ctgggcactg 1140
gacctctgag agctctgtat ctggtagtac tggacaatgg cactctgaat ctggaagttt 1200
taggccagat agcccaggct ctgggaacgc gaggcctaac aaccagact ggggcacatt 1260
tgaagaggtg tcaggaaatg taagtccagg gacaaggaga gagtaccaca cagaaaaact 1320
ggtcacttct aaaggagata aagagctcag gactggtaaa gagaaggcca cctctggtag 1380
cacaaccacc acgcgtcggt catgctctaa aaccgttact aagactgtta ttggctctga 1440
tggtcacaaa gaagttacca aagaagtggg gacctccgaa gatgggttctg actgtcccga 1500
ggcaatggat ttaggcacat tgtctggcat aggtactctg gatgggttcc gccataggca 1560
ccctgatgaa gctgccttct tcgacactgc ctcaactgga aaaacattcc caggtttctt 1620
ctcacctatg ttaggagagt ttgtcagtga gactgagtct aggggctcag aatctggcat 1680
cttcacaaat acaaaggaat ccagttctca tcaccctggg atagctgaat tcccttcccg 1740
tggtaaatct tcaagttaca gcaacaatt tactagtagc acgagttaca acagaggaga 1800
ctccacattt gaaagcaaga gctataaaat ggcagatgag gccggaagtg aagccgatca 1860
tgaaggaaca catagcacca agagaggcca tgctaaatct cgccctgtca gaggtatcca 1920
cacttctcct ttggggaagc cttccctgtc cccctagtaa gtcgacggat ccatcgatgg 1980

<210> 8
<211> 1479
<212> DNA
<213> Human

<400> 8
ccccaagctt gtcgacgcca ccatgaaaca tctattattg ctactattgt gtgtttttct 60
agttaagtcc caaggtgtca acgacaatga ggagggtttc ttcagtgccg gtggtcatcg 120

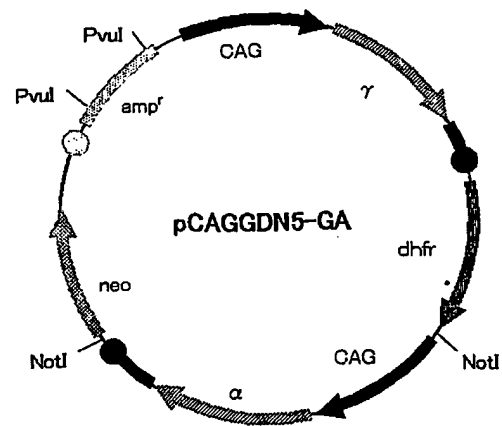
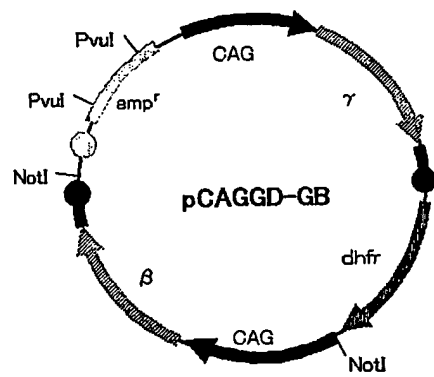
accccttgac aagaagagag aagaggctcc cagcctgagg cctgccccac cgcccatcag 180
 tggagggtggc tatcgggctc gtccagccaa agcagctgcc actcaaaaga aagtagaaaag 240
 aaaagccccct gatgctggag gctgtcttca cgctgaccca gacctggggg tgttgtgtcc 300
 tacaggatgt cagttgcaag aggctttgct acaacaggaa aggccaatca gaaatagtgt 360
 tgatgagtta aataacaatg tggaagctgt ttcccagacc tcctcttctt cctttcagta 420
 catgtatttg ctgaaagacc tgtggcaaaa gaggcagaag caagtaaaag ataatgaaaa 480
 tgtagtcaat gagtactcct cagaactgga aaagcaccaa ttatatatag atgagactgt 540
 gaatagcaat atcccaacta accttcgtgt gcttcgttca atcctggaaa acctgagaag 600
 caaaatacaa aagttagaat ctgatgtctc agctcaaatg gaatattgtc gcaccccatg 660
 cactgtcagt tgcaatattc ctgtggtgtc tggcaaagaa tgtgaggaaa ttatcaggaa 720
 aggaggtgaa acatctgaaa tgtatctcat tcaacctgac agttctgtca aaccgtatag 780
 agtatactgt gacatgaata cagaaaatgg aggatggaca gtgattcaga accgtcaaga 840
 cggtagtggt gactttggca ggaaatggga tccatataaa cagggatttg gaaatgttgc 900
 aaccaacaca gatgggaaga attactgtgg cctaccaggt gaatattggc ttggaaatga 960
 taaaattagc cagcttacca ggatgggacc cacagaactt ttgatagaaa tggaggactg 1020
 gaaaggagac aaagtaaagg ctactatgg aggattcact gtacagaatg aagccaacaa 1080
 ataccagatc tcagtgaaca aatacagagg aacagccggt aatgccctca tggatggagc 1140
 atctcagctg atgggagaaa acaggacat gaccattcac aacggcatgt tcttcagcac 1200
 gtatgacaga gacaatgacg gctggttaac atcagatccc agaaaacagt gttctaaaga 1260
 agacggtggt ggatggtggt ataatagatg tcatgcagcc aatccaaacg gcagatacta 1320
 ctgggggtgga cagtacacct gggacatggc aaagcatggc acagatgatg gtgtagtatg 1380
 gatgaattgg aaggggtcat ggtactcaat gaggaagatg agtatgaaga tcaggccctt 1440
 cttccacag caatagtaag tcgactgatc agaattccg 1479

<212> DNA
<213> Human

<400> 9
 cccaagctt gtcgacgcc ccatgagttg gtccttgac ccccggaatt taattctcta 60
 cttctatgct cttttatttc tctcttcaac atgtgtagca tatgttgcta ccagagacaa 120
 ctgctgcac ttagatgaaa gattcggtag ttattgtcca actacctgtg gcattgcaga 180
 tttctgtct acttatcaaa ccaaagtaga caaggatcta cagtctttgg aagacatctt 240
 acatcaagtt gaaaacaaaa catcagaagt caaacagctg ataaaagcaa tccaactcac 300
 ttataatcct gatgaatcat caaaacaaa tatgatagac gctgctactt tgaagtccag 360
 gaaaatgtta gaagaaatta tgaaatatga agcatcgatt ttaacacatg actcaagtat 420
 tcgatatttg caggaaatat ataattcaaa taatcaaaag attgttaacc tgaaagagaa 480
 ggtagcccag ctgaagcac agtgccagga accttgcaaa gacacggtgc aaatccatga 540
 tatcactggg aaagattgtc aagacattgc caataaggga gctaaacaga gcgggcttta 600
 cttattaaa cctctgaaag ctaaccagca attcttagtc tactgtgaaa tcgatgggtc 660
 tggaatgga tggacttgtt ttcagaagag acttgatggc agttagatt tcaagaaaaa 720
 ctggattcaa tataaagaag gatttggaca tctgtctcct actggcaca cagaattttg 780
 gctgggaaat gagaagattc atttgataag cacacagtct gccatcccat atgcattaag 840
 agtggaaactg gaagactgga atggcagaac cagtactgca gactatgcca tgttcaaggt 900
 gggacctgaa gctgacaagt accgcctaac atatgcctac ttcgctggtg gggatgctgg 960
 agatgccttt gatggctttg attttggcga tgatcctagt gacaagtttt tcacatccca 1020
 taatggcatg cagttcagta cctgggacaa tgacaatgat aagtttgaag gcaactgtgc 1080
 tgaacaggat ggatctggtt ggtggatgaa caagtgtcac gctggccatc tcaatggagt 1140
 ttattaccaa ggtggcactt actcaaaagc atctactcct aatggttatg ataatggcat 1200
 tatttgggcc acttgaaaaa cccggtggta ttcatgaag aaaaccacta tgaagataat 1260
 cccattcaac agactcaca ttggagaagg acagcaacac cacctggggg gagccaaaca 1320
 ggctggagac gtttaataag tcgacggatc cgaattccg 1359

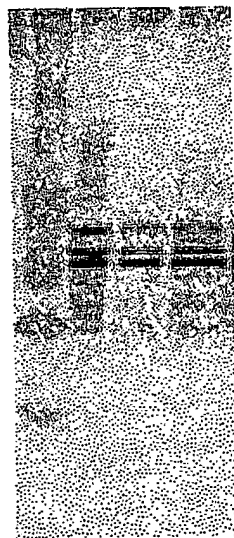
【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

1 2 3 4



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 フィブリノゲンを高発現する組換えフィブリノゲン産生細胞及びその作製方法を提供する。

【解決手段】 フィブリノゲンを構成する3種のタンパク質、 α 鎖（もしくは α 鎖の異型）、 β 鎖、 γ 鎖（もしくは γ 鎖の異型）をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いて動物細胞を形質転換する際に、それぞれの遺伝子の構成比を、 γ 鎖（及び／もしくは γ 鎖の異型）遺伝子が、 α 鎖（及び／もしくは α 鎖の異型）遺伝子及び β 鎖遺伝子に対して等量から3倍量にすることを特徴とする組換えフィブリノゲン産生細胞の作製方法及び当該方法によって作製された組換えフィブリノゲン産生細胞。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-282033
受付番号	50301255426
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 7月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 7月29日
-------	-------------

特願 2003-282033

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所